

DERWENT-ACC-NO: 2004-000540  
DERWENT-WEEK: 200402  
COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Pretreating fecal samples, useful for detecting Helicobacter pylori antigens, by releasing antigens from endogenous antibodies, to allow their immunochemical detection

INVENTOR: WENGLER, G S; WENGLER, G

PATENT-ASSIGNEE: WENGLER G S (WENGI), WENGLER G (WENGI)

PRIORITY-DATA: 2002DE-1019741 (May 2, 2002)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> <u>WO 2003093818 A2</u>	November 13, 2003	G	000	G01N033/53
<input type="checkbox"/> <u>DE 10219741 A1</u>	November 13, 2003		008	G01N033/569

DESIGNATED-STATES: BR CA CN JP US AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU  
IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
WO2003093818A2	April 30, 2003	2003WO-EP04571	
DE 10219741A1	May 2, 2002	2002DE-1019741	

INT-CL (IPC): C12Q 1/04; G01N 1/28; G01N 33/53; G01N 33/569

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 10219741A  
BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Pretreating a fecal sample so as to release Helicobacter pylori antigens (Ag) from their complexes with endogenous antibodies (Ab) before testing for Ag by an immunological technique.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) kit for the new process; and
- (2) kit for immunological detection of Ag in fecal samples comprising a pretreating component and a detection component, preferably a monoclonal antibody.

USE - The method is used for diagnosis of Helicobacter pylori infections.

ADVANTAGE - By releasing Ag from endogenous complexes, the method increases the sensitivity and specificity of subsequent immunological tests.

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 10219741A  
EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04 D16 S03

CPI-CODES: B04-B04B2; B04-B04C1; B04-G07; B04-G21; B11-C07A; B11-C08D1; B11-C08D3;  
B12-K04A4; D05-H04; D05-H11A; D05-H13;

EPI-CODES: S03-E13D; S03-E14H4;



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 19 741 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 33/569**  
G 01 N 1/28  
C 12 Q 1/04

⑦ Aktenzeichen: 102 19 741.5  
② Anmeldetag: 2. 5. 2002  
④ Offenlegungstag: 13. 11. 2003

**DE 102 19 741 A 1**

⑦ Anmelder:  
Wengler, Georg S., Dr. Dr., Oberhofen, AT  
  
⑦a Vertreter:  
Hoefer & Partner, 81545 München

⑦b Erfinder:  
gleich Anmelder

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤a Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben  
⑤b Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben, um H.pylori-Antigene aus Bindungen mit endogenen Antikörpern abzuspalten, wobei besagte Vorbehandlung vor der Untersuchung auf H.pylori-Antigene im Stuhl mittels immunologischer Techniken durchgeführt wird.

**DE 102 19 741 A 1**

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 1.

5

## Stand der Technik

[0002] H.pylori ist ein gram-negatives Bakterium mit Vorkommen im gastrointestinalen Bereich, welches hauptverantwortlich für chronische Gastritis und peptischen Ulkus ist. Eine Infektion stellt u. a. einen wichtigen Risikofaktor bei der Entwicklung von Magenkrebs dar.

- 10 [0003] Die Diagnose einer Infektion kann mittels einer Biopsie, die während einer Gastroskopie entnommen wird, durchgeführt werden. Eine Infektion kann auch mit nicht-invasiven Methoden diagnostiziert werden, welche dem Patienten die Unannehmlichkeiten der endoskopischen Untersuchung ersparen. Weniger gängig sind der Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum, der Atemtest und der Nachweis von Fäkal-Antigenen. Im Vergleich zueinander hat jedes dieser Verfahren positive und negative Aspekte. Die Serologie ist wirtschaftlich, hat aber das grundsätzliche Problem, dass Antikörper auch nach Ausheilung vorliegen können und daher ihr Nachweis die Ursache von falsch-positiven
- 15 Ergebnissen sein kann. Der Atemtest zeigt eine erhöhte Sensibilität und Spezifität, ist aber zeitaufwendig für den Patienten und erfordert im Übrigen teure Ausrüstung.

- [0004] Der Nachweis von Antigenen, Bakterien oder bakteriellen DNA-Fragmenten von H.pylori im Stuhl erscheint besonders interessant, denn er beansprucht den Patienten nicht stark und ist im Unterschied zum Antikörpernachweis ein direkter Ausdruck einer akuten Infektion. Es sind verschiedene Techniken für den Nachweis einer H.pylori-Infektion aus Stuhlproben bekannt. Anzuchtuntersuchungen lieferten keine vielversprechenden Ergebnisse. Die PCR ist eine effiziente Methode zum Nachweis von bakterieller DNA in biologischen Proben, allerdings ist ihre Anwendung auf Stuhlproben durch die Reaktion hemmende Substanzen behindert. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Hemmstoffe zu entfernen. Die Resultate sind widersprüchlich.

- 20 [0005] Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben zu schaffen, mit dem es möglich ist, endogene Antikörper von Fäkalantigenen des H.pylori abzuspalten und so die Sensibilität und Spezifität in immunologischen Assays zur Diagnostik von H.pylori-Infektionen zu verbessern.

[0006] Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1.

- [0007] Erfindungsgemäß wird dementsprechend eine Vorbehandlungsmethode von Stuhlproben vor einem immunologischen Test am Stuhl geschaffen, um H.pylori-Antigene nachzuweisen oder zu isolieren, wobei die Vorbehandlung Wechselwirkungen zwischen endogenen Antikörpern und H.pylori-Antigenen bei der Durchführung des Tests verringert oder eliminiert.

[0008] In Anspruch 16 ist ferner ein Kit zur Vorbehandlung von Stuhlproben als selbständig handelbares Objekt definiert.

- 30 [0009] In Anspruch 17 ist ebenfalls als selbständig handelbares Objekt ein Kit für den immunologischen Nachweis von H.pylori-Antigenen in Stuhlproben definiert.

## Detaillierte Beschreibung

- 40 [0010] Die vorliegende Erfindung befasst eine Vorbehandlung von Stuhlproben, um Wechselwirkungen von endogenen Antikörper in einer nachfolgenden immunologischen Untersuchung zu entfernen oder zu beseitigen, sowie die Isolation von Antigenen von H.pylori aus dem Stuhl.

- [0011] Die Vorbehandlung basiert auf der Anwendung von Methoden zur Aufspaltung von Antigenen-Antikörper-Bindungen, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Affinitäts Chromatographie, der sich mit dem Aufbrechen von Bindungen zwischen H.pylori-Antigenen und endogenen Antikörpern in Stuhlproben befasst, wohlbekannt sind. Die vorbehandelte Probe ist dazu bestimmt, in einem nachfolgenden Immun-Assay auf H.pylori-Antigene untersucht zu werden oder um Antigene von Helicobacter pylori zu isolieren. Die Freisetzung von Antigenen von endogenen Antikörpern, erhält-  
 45 lich in der Folge der erfindungsgemäßen Vorbehandlungen, erleichtert die Erkennung der Fäkalantigene durch Antikörper, auf die das immunologische Verfahren begründet ist und verbessert dadurch die Effizienz des besagten Systems.

- 50 [0012] Im Folgenden werden einige bevorzugte erfindungsgemäße Vorbehandlungen beschrieben.

1. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit mit chemischen Eigenschaften, geeignet um eventuelle. Antigen-Antikörper-Immunkomplexe vollständig oder teilweise zu dissoziieren.
- 55 2. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit mit chemischen Eigenschaften, geeignet um eventuelle. Antigen-Antikörper-Immunkomplexe vollständig oder teilweise zu dissoziieren;
  - b) vollständiges oder teilweises Abtrennen von H.pylori-Antigenen von endogenen Antikörpern.
- 60 3. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit mit chemischen Eigenschaften, geeignet um evtl. Antigen-Antikörper-Immunkomplexe vollständig oder teilweise zu dissoziieren;
  - b) Hinzufügen zu der erhaltenen Fäkalsuspension von einem Reagenz, das in der Lage ist, die Wiedervereinigung von H.pylori-Antigenen mit spezifischen oder cross-reaktiven endogenen Antikörpern vollständig oder teilweise zu hemmen.
- 65 4. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit;
  - b) Behandlung der gemäß 4a) erhaltenen Suspension mit physikalischen Methoden, die geeignet sind, um Immunkomplexe, gebildet aus H.pylori-Antigen und spezifischen oder cross-reaktiven endogenen Antikörpern

- perns des Organismus, von welchem die Probe stammt, vollständig oder teilweise zu dissoziieren.
5. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
    - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit;
    - b) Behandlung der gemäß 5a) erhaltenen Suspension mit physikalischen Methoden, die geeignet sind, um Immunkomplexe, gebildet aus H.pylori-Antigenen und spezifischen oder cross-reaktiven endogenen Antikörpern des Organismus, von welchem die Probe stammt, vollständig oder teilweise zu dissoziieren;
    - c) vollständiges oder teilweises Abspalten von Helicobacter pylori-Antigenen von endogenen Antikörpern.
  6. Vorbehandlung von Stuhlproben, umfassend die folgenden Schritte:
    - a) in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit;
    - b) Behandlung der gemäß 6a) erhaltenen Suspension mit physikalischen Methoden, die geeignet sind, um Immunkomplexe, gebildet aus H.pylori-Antigenen und spezifischen oder cross-reaktiven endogenen Antikörpern des Organismus, von welchem die Probe stammt, vollständig oder teilweise zu dissoziieren;
    - c) Hinzufügen zu der erhaltenen Fäkalsuspension von einem Reagenz, das in der Lage ist, die Wiedervereinigung von Helicobacter pylori-Antigenen mit spezifischen oder cross-reaktiven endogenen Antikörpern vollständig oder teilweise zu hemmen.
  7. Vorbehandlung von Stuhlproben, bestehend aus einer Kombination von zwei oder mehr der vorangegangenen Vorbehandlungen.

[0013] Jedwede Behandlung von Stuhlproben, die eine Aufspaltung von H.pylori-Antigenen und endogenen Anti-H.pylori-Antikörpern oder mit H.pylori cross-reaktiven Antikörpern bewirkt, gehört zur Erfindung. Wie bereits erwähnt, können die Methoden zur Aufspaltung von Antigen-Antikörper-Bindungen chemischer oder physikalischer Art sein. Eine gängige Methode unter den Chemischen ist das Aussetzen der Probe einem niedrigen oder einem hohen pH-Wert. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Stuhlprobe mit einer sauren Lösung in Kontakt gebracht, um eine Fäkalsuspension von einem pH unter 4 zu erhalten. Ein derartiges, nicht begrenzendes Beispiel ist eine Pufferlösung mit 100 mM Glyzin pH 2,5, wie mitgeteilt mit Beispiel 1 und 2.

[0014] Die Dissoziation von fäkalen Immunkomplexen mit chemischen Methoden kann auch erzielt werden, indem die Stuhlproben mit einer Lösung mit erhöhter Ionenstärke in Kontakt gebracht werden. Eine häufiger verwendete physikalische Methode, um Immunkomplexe aufzuspalten, ist die Exposition bei Hitze. Ein typisches Beispiel gemäß der Erfindung ist die Herstellung einer Fäkalsuspension in einer Lösung und die anschließende Erhitzung auf über 40°C. Eine weitere chemische Methode, um Antigen-Antikörper-Bindungen aufzubrechen, besteht in der Vorbehandlung der Stuhlprobe mit chaotropischen Ionen, die die Struktur von Wassermolekülen zerstören und hydrophobe Wechselwirkungen reduzieren (z. B. Natriumhydrid, Kaliumtiosyanat, Magnesiumchlorid, Trifluor-Essigsäure). Es gibt auch Substanzen, die angewendet in hoher Konzentration in der Lage sind, Antigen-Antikörper-Bindungen aufzuspalten. Ein Beispiel sind Harnstoff und Guanidin HCL, die in der Lage sind, Proteine zu denaturieren. Auch Substanzen, die in der Lage sind, die Ladung der Lösung zu reduzieren, sind in der Lage eine Dissoziation der Immunkomplexe auszuführen. Wie z. B. Dioxin und Äthylen-Glykol. In einigen Fällen ist auch die Verwendung von hohen Salzkonzentrationen in der Lage, Antigen-Antikörper-Bindungen zu brechen oder wenigstens zu schwächen.

[0015] Eine zweite Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Anwendung von Methoden, um nach der Dissoziation von fäkalen Immunkomplexen die Antigene von den endogenen Antikörpern abzutrennen. Die Trennungsphase bewirkt, dass vermieden wird, dass die endogenen Antikörper von neuem an die Antigene binden, vor oder während dessen die immunologischen Untersuchungen durchgeführt werden oder die Fäkalantigene isoliert werden. Ein weiterer Zweck ist es, Wechselwirkungen von endogenen Antikörpern zu vermeiden, sei es in einer kompetitiven oder nichtkompetitiven immunologischen Reaktion.

[0016] Die Abtrennung von Fäkalantigenen von endogenen Antikörpern nach der Aufspaltung der Immunkomplexe kann gemäß der vorliegenden Erfindung auf drei verschiedene Weisen durchgeführt werden.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Suspension der Stuhlprobe, die gemäß einer der oben beschriebenen Methoden zur Aufspaltung von Antigen-Antikörperkomplexen vorbehandelt wurde, einer Zentrifugation unterzogen. Der Überstand, der freie endogene Antikörper enthält, wird von dem Sediment abgetrennt. Die Fraktion mit den abgesetzten Antigenen, abgetrennt von endogenen Antikörpern, wird mit einer Flüssigkeit in Kontakt gebracht und anschließend immunologischen Untersuchungsmethoden unterzogen. Alternativ werden fäkale H.pylori Antigene isoliert.

[0018] In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird die Abtrennung von freiem Antigen von endogenen Antikörpern nach Vorbehandlung mit einer der oben beschriebenen Methoden zur Dissoziation von Antigen-Antikörperkomplexen mittels Filtration erreicht, wobei Filter verwendet werden, die die Antigen-Fraktion zurückhalten, während sie gleichzeitig die endogenen Antikörper enthaltenen Anteile durchpassieren lassen. Die filterbehandelte, Antigen enthaltende Fraktion, wird mit einer Flüssigkeit in Kontakt gebracht und anschließend einer immunologischen Untersuchungsmethode unterzogen. Alternativ werden fäkale H.pylori Antigene isoliert.

[0019] In einer dritten bevorzugten Ausführungsform wird die Abtrennung von freien Antigenen von endogenen Antikörpern nach Vorbehandlung mit einer der oben beschriebenen Methoden zur Dissoziation von Antigen-Antikörperkomplexen erzielt durch eine technische Chromatographie. Die mittels technischer Chromatographie gereinigte Antigen-Fraktion wird in Kontakt gebracht mit einer Flüssigkeit und anschließend einer immunologischen Untersuchungsmethode. Alternativ werden fäkale H.pylori Antigene isoliert.

[0020] Dass die Phase der Trennung der Anti-H.pylori-Antikörper von den Antigenen nach dem Schritt der Dissoziation der fäkalen Immunkomplexe stattfindet, ist ein wichtiger Aspekt der Erfindung, auch wenn es keine zwingende Abfolge ist. Die vorliegende Erfindung betrifft in der Tat auch eine Vorbehandlung, die ausschließlich eine Trennungsphase der Immunkomplexe umfasst, wie bereits in dem oben beschriebenen ersten und vierten Verfahren dargestellt. Die Vorbehandlungsverfahren für Stuhlproben sind gemäß der vorliegenden Erfindung auf alle immunologischen Tests anwendbar, die sich mit der Untersuchung von H.pylori-Antigenen in im Stuhl befassen. Diese immunologischen Untersuchungsverfahren sind dem Fachmann wohl bekannt. Sie können von kompetitiver oder nichtkompetitiver Art sein und

sie setzen normalerweise polyklonale und/oder monoklonale Antikörper oder Fragmente hiervon, die spezifisch für bestimmte H.pylori-Antigene sind, ein.

[0021] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung auf immunologische Diagnostizier-Assays einer H.pylori-Infektion anwendbar, wie sie in den oben zitierten Patenten beschrieben ist.

- 5 [0022] Im Patent WO 9824885 werden immunologische Methoden beansprucht, die eine H.pylori-Infektion mittels Untersuchungen auf ein Antigen mit einem Gewicht von offensichtlich 16 +/- 2 kDa bestimmen. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende Erfindung anwendbar auf die Dissoziation von fäkalen Immunkomplexen, die aus Antigenen, wie sie im Patent WO 9824885 beschrieben sind und endogenen Antikörper, die in der Probe vorhanden sind, anwendbar. Eine typische Anwendung der Erfindung, die in keiner Weise limitierend sein soll, betrifft
- 10 die Untersuchung des Antigens, welches beschrieben ist im Patent WO 9824885 und im Beispiel 1. Die erfindungsgemäßen Vorbehandlungsmethoden von Stuhlproben sind auch anwendbar auf Methoden, die dem Fachmann wohlbekannte Methoden anwenden, um Antigen-Antikörper-Reaktionen für die Trennung von Fragmenten und/oder H.pylori-Bakterienzellen zu verwenden, von denen nachfolgend bakterielle DNA extrahiert wird, um eine Analyse der spezifischen Nukleotidsequenz von H.pylori durchzuführen. Die erfindungsgemäßen Vorbehandlungsmethoden von Stuhlproben sind
- 15 auch anwendbar auf Methoden, die Antigen-Antikörper-Reaktionen für die Trennung von H.pylori aus dem Stuhl zur Isolierung von Bakterienkulturen verwenden.

[0023] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher. Solche Beispiele sollen keineswegs in einer Art und Weise interpretiert werden, so dass die allgemeine Erfindung oder die nachfolgenden Ansprüche beschränkt werden.

20

## BEISPIEL 1

Vorbehandlung von Stuhlproben mit chemischen Methoden. Anwendung eines nichtkompetitiven Immun-Assays, welches auf monoklonalen Antikörpern basiert

- 25 [0024] Patienten: Die verwendeten Stuhlproben stammen von 20 Patienten, die sich einer Gastroskopie unterzogen hatten. Basierend auf einer histologischen Untersuchung und einem Harnstoffatemtest waren 15 davon mit H.pylori infiziert, weitere 5 waren nicht infiziert.

- [0025] Vorbehandlung der Stuhlproben: Die Stuhlproben eines jeden Patienten wurden gemäß des folgenden Protokolls vorbehandelt: 100–200 mg der Stuhlprobe wurden in ein konisches Reagenzgefäß, Modell Eppendorf 1,5 ml, überführt. Es wurde 1 ml Glycinpuffer 100 mM pH 2,5, der 0,5 mol/l Natriumchlorid (Dissoziierungspuffer) enthält, hinzugefügt. Nachdem sich die Stuhlprobe unter vortexen aufgelöst hatte, wurde die Probe für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. 0,9 ml des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf 1,5 ml-Gefäß überführt und weitere 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurde das Pellet in 0,3 ml eines Puffers, enthaltend 0,2 M Tris pH 8,5 und 3 mol/l Kaliumchlorid aufgenommen. Diese Suspension wird
- 35 für die nachfolgenden immun-enzymatischen Assays verwendet.

- [0026] Nicht vorbehandelte Stuhlproben: 100–200 mg der Stuhlprobe werden in ein konisches Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, überführt. Es wird 1 ml phosphatgepufferte Saline (PBS) zu der Probe gegeben. Nachdem die Probe unter vortexen aufgelöst wurde, wird das Reagenzglas für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird für die nachfolgenden immunologisch enzymatischen Assays verwendet.

- 40 [0027] Immunologisch enzymatisches Assay: Entsprechend den Anweisungen aus Patent WO 9824885 mit dem Titel "Helicobacter pylori antigen having an apparent molecular weight of 16+/kDa, a specific antibody, and its use for the detection of said antigen" wurde ein monoklonaler Antikörper der Klasse IgG (AM524A), der gerichtet ist gegen das H.pylori-Antigen mit dem offensichtlichen Gewicht von 16 kDa, produziert. Dieser wurde anschließend in einem nichtkompetitiven immun-enzymatischen Assay des Sandwich ELISA-Typs wie nachfolgend beschrieben, eingesetzt: Die Mikrovertiefungen der ELISA-Platte (NUNC maxisorp) wurden mit 100 µl des monoklonalen Antikörpers AM524A in einer Konzentration von 10 µg/ml in Natriumkarbonatpuffer 50 mM pH 9,5 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Flüssigkeit mittels Aspiration entfernt worden war, wurden die Vertiefungen mit 200 µl PBS, enthalten 0,5% bovinen Serumalbumin (BSA) für 16 Std. bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Vertiefungen werden nachfolgend 2 x mit PBS gewaschen. Dann werden den Vertiefungen je 100 µl im Doppelansatz der Fäkalsuspension vorbehandelt und nicht
- 50 vorbehandelt, wie oben beschrieben, zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur in einem Schüttler für Mikroplatten werden die Vertiefungen 5 x mit PBS gewaschen. 100 µl eines biotinierten monoklonalen Antikörpers in der Konzentration von 1 µg/ml in PBS, enthaltend 1% BSA, werden auf die Vertiefungen verteilt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Zu den selben Vertiefungen wird dann je 100 µl Streptavidin, gebunden an Peroxidase (Sigma), in einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS, enthaltend 1% BSA, hinzugegeben. Nach
- 55 15 Minuten Inkubationszeit unter Schütteln werden die Vertiefungen 5 x mit 250 µl PBS gewaschen. 100 µl einer Lösung, die 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin (TMB) enthält und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden allen Vertiefungen zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wird nach 10 Minuten mit 50 µl einer 2 N HCL blockiert. Die optische Dichte wird mit einem Spektrometer für Mikroplatten bei 450 nm unter Verwendung eines 620 nm-Filters bestimmt.

- [0028] Ergebnis: Die optische Dichte gemäß des ELISA-Testes von den zu untersuchenden Stuhlproben mit und ohne Vorbehandlung gemäß der vorliegenden Erfindung ist in der folgenden Tabelle dargestellt:
- 60

65

Tabelle

Beispiel 1

Patienten	OD.450 nM (mit Vorbehandlung)	OD.450 nM (ohne Vorbehandlung)
HP negativ no. 01	0.063	0.168
HP negativ no. 02	0.060	0.098
HP negativ no. 03	0.063	0.122
HP negativ no. 04	0.063	0.130
HP negativ no. 05	0.057	0.188
HP positiv no. 01	1.096	0.950
HP positiv no. 02	2.652	1.153
HP positiv no. 03	2.729	2.240

HP positiv no. 04	1.358	0.369
HP positiv no. 05	0.810	0.770
HP positiv no. 06	2.733	0.080
HP positiv no. 07	1.312	1.244
HP positiv no. 08	1.783	1.882
HP positiv no. 09	2.424	0.430
HP positiv no. 10	1.824	0.035
HP positiv no. 11	2.455	2.244
HP positiv no. 12	2.120	1.532
HP positiv no. 13	0.879	0.057
HP positiv no. 14	0.450	0.320
HP positiv no. 15	0.870	0.845

[0029] Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen die vorbehandelten Proben oft eine höhere optische Dichte im Vergleich zu nicht vorbehandelten Proben. Folglich erhöht sich die diagnostische Sensibilität und Spezifität des immun-enzymatischen Tests.

## BEISPIEL 2

Vorbehandlung der Stuhlproben mit chemischen Methoden. Anwendung eines nichtkompetitiven immun-enzymatischen Assays, das auf polyklonalen Antikörpern beruht

[0030] Patienten: Die verwendeten Stuhlproben stammen von 20 Patienten, die sich einer Gastroskopie unterzogen hatten. Basierend auf einer histologischen Untersuchung und einem Harnstoffatemtest waren 15 davon mit *H.pylori* infiziert, weitere 5 waren nicht infiziert.

[0031] Vorbehandlung der Stuhlproben: Die Stuhlproben eines jeden Patienten wurden gemäß des folgenden Protokolls vorbehandelt: 100–200 mg der Stuhlprobe wurden in ein konisches Reagenzgefäß, Modell Eppendorf 1,5 ml, überführt. Es wurde 1 ml Glycinpuffer 100 mM pH 2,5, der 0,5 mol/l Natriumchlorid (Dissoziierungspuffer) enthält, hinzugefügt. Nachdem sich die Stuhlprobe unter vortexen aufgelöst hatte, wurde die Probe für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. 0,9 ml des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf 1,5 ml-Gefäß überführt und weitere 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurde das Pellet in 1 ml eines Puffers, enthaltend 200 mM Tris pH 7,5 aufgenommen. Diese Suspension wird für die nachfolgenden immun-enzymatischen Assays verwendet.

[0032] Nicht vorbehandelte Stuhlproben: 100–200 mg der Stuhlprobe werden in ein konisches Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, überführt. Es wird 1 ml eines 200 mM Tris Puffers pH 7,5 enthaltend 0,9% KCl zu der Probe gegeben. Nachdem die Probe unter vortexen aufgelöst wurde, wird das Reagenzglas für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird für die nachfolgenden immunologisch enzymatischen Assays verwendet.

[0033] Immunologisch enzymatisches Assay: Das verwendete diagnostische Verfahren basiert auf einem Sandwich Assay, mit Immunglobulin eines mit *H.pylori* geimpften Hasen. Das Verfahren ist das folgende: Die Mikrovertiefungen der ELISA-Platte (NUNC maxisorp) wurden mit 100 µl des Anti-*H.pylori*-Hasenimmunglobulins in einer Konzentration von 10 µg/ml in Natriumkarbonatpuffer 50 mM pH 9,5 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Flüssigkeit mittels Aspiration entfernt worden war, wurden die Vertiefungen mit 200 µl PBS, enthalten 0,5% bovines Serumalbumin (BSA) für 16 Std. bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Vertiefungen werden nachfolgend 2 × mit PBS gewaschen. Dann werden den Vertiefungen je 100 µl im Doppelansatz der Fäkalsuspension vorbehandelt und nicht vorbehandelt, wie oben beschrieben, zugesetzt. Gleich anschließend wird allem Mikrovertiefungen 100 µl eines biotinierten, polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten Hasenimmunglobulins in der Konzentration von 2 µg/ml in PBS, enthaltend 1% BSA zugegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Vertiefungen werden dann 5 × mit 250 µl PBS ge-

waschen.

[0034] 100 µl einer Färbelösung, die TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthält, werden allen Vertiefungen zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wird nach 10 Minuten mit 50 µl einer 2 N HCL blockiert. Die optische Dichte wird mit einem Spektrometer für Mikroplatten bei 450 nm unter Verwendung eines 620 nm-Filters bestimmt.

- 5 [0035] Ergebnis: Die optische Dichte gemäß des ELISA-Testes von den zu untersuchenden Stuhlproben mit und ohne Vorbehandlung gemäß der vorliegenden Erfindung ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle

Beispiel 2

10

15

20

25

30

35

Patienten	OD.450 nM (mit Vorbehandlung)	OD.450 nM (ohne Vorbehandlung)
HP negativ no. 01	0.078	0.128
HP negativ no. 02	0.083	0.133
HP negativ no. 03	0.073	0.117
HP negativ no. 04	0.121	0.148
HP negativ no. 05	0.059	0.128
HP positiv no. 01	0.780	0.665
HP positiv no. 02	2.242	1.945
HP positiv no. 03	1.365	0.738
HP positiv no. 04	1.398	0.232
HP positiv no. 05	0.780	0.126
HP positiv no. 06	1.377	0.322
HP positiv no. 07	1.512	1.623
HP positiv no. 08	2.020	1.820
HP positiv no. 09	1.477	0.745
HP positiv no. 10	1.266	0.112
HP positiv no. 11	1.587	1.023
HP positiv no. 12	2.430	1.428
HP positiv no. 13	0.800	0.138
HP positiv no. 14	0.920	0.380
HP positiv no. 15	0.140	0.124

- 40 [0036] Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen die vorbehandelten Proben oft eine höhere optische Dichte im Vergleich zu nicht vorbehandelten Proben. Folglich erhöht sich die diagnostische Sensibilität und Spezifität des immun-enzymatischen Tests.

#### BEISPIEL 3

45

Vorbehandlung von Stuhlproben mit chemischen und immunologischen Methoden für ein nachfolgendes immun-enzymatisches Assay auf Fäkalantigene von H.pylori

- 50 [0037] Vorbehandlung der Stuhlproben: 100–200 mg der Stuhlproben werden in ein konisches Reagenzgefäß, Modell Eppendorf, 1,5 ml, überführt. 1 ml eines Gycinpuffers 100 mM pH 2,5 enthalten 0,5 mol/l Natriumchlorid (Dissoziierungspuffer) wird der Probe zugegeben. Nachdem die Stuhlprobe unter vortexen aufgelöst wurde, wird das Reagenzglas für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden in ein neues Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, überführt. Zu dem Reagenzglas werden 0,5 ml einer Pufferlösung, enthalten 2,0 M Tris pH 8,5 und 3 mol/l Kaliumchlorid sowie 20 mg/ml Hasenantiseraum gerichtet gegen menschliches
- 55 Immunglobulin, welches mit Mausimmunglobulin vorinkubiert wurde, hinzugegeben. Das Reagenzglas wird für 4–5 Sekunden gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das immunenzymatische Assay durchgeführt wird.

- 60 [0038] Immun-enzymatisches Assay: Das verwendete immun-enzymatische Assay entspricht dem unter Beispiel 1 beschriebenen, welches monoklonale Antikörper verwendet oder dem gemäß Beispiel 2, welches polyklonale Antikörper verwendet.

#### BEISPIEL 4

65 Vorbehandlung der Stuhlprobe mit physikalischen Methoden für ein nachfolgendes immun-enzymatisches Assay auf fäkal H.pylori-Antigene

- [0039] Vorbehandlung: 100–200 mg der Stuhlprobe werden in ein konisches Reagenzgefäß, Modell Eppendorf, 1,5 ml, überführt. 1 ml 0,1 M Tris Puffer pH 8,5 enthaltend 0,5 mol/l Natriumchlorid werden der Probe zugegeben.



Nachdem die Stuhlprobe unter vortexen aufgelöst wurde, wird das Reagenzglas für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden in ein neues Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, transferiert. Das Reagenzglas, enthaltend die Probe, wird dann für 5 Minuten auf 60°C erhitzt und anschließend sofort bei 14000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand mittels Aspiration abgenommen wurde, wird das Pellet unter Hinzufügen von 0,3 ml eines 0,2 M Tris Puffers pH 8,5, enthaltend 3 mol/l Kaliumchlorid, resuspendiert. [0040] Immun-enzymatisches Assay: Das verwendete immun-enzymatische Assay entspricht dem unter Beispiel 1 beschriebenen, welches monoklonale Antikörper verwendet oder dem gemäß Beispiel 2, welches polyklonale Antikörper verwendet.

## BEISPIEL 5

Vorbehandlung von Stuhlproben für die immunologische Extraktion von *Helicobacter pylori* Bakterien oder Fragmenten davon

[0041] Vorbehandlung: 100–200 mg der Stuhlprobe werden in ein konisches Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, transferiert. 1 ml 0,1 Glycinpuffer 100 mM, pH 2,5 enthalten 0,5 mol/l Natriumchlorid (Dissoziierungspuffer), wird der Probe zugegeben. Nachdem die Stuhlprobe unter vortexen aufgelöst wurde, wird das Reagenzglas für 5 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden in ein neues Reagenzglas, Modell Eppendorf, 1,5 ml, transferiert. Nachdem 0,5 ml des Dissoziierungspuffer zugegeben wurden, wird das Reagenzglas 4–5 Sekunden gevortext und bei 14000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand durch Aspiration abgenommen wurde, wird das Pellet mit 0,3 ml eines 0,2 M Tris Puffers pH 8,5, enthaltend 3 mol/l Kaliumchlorid, resuspendiert.

[0042] Immunologische Extraktion der *Helicobacter pylori* Bakterien oder Fragmenten: 20 µl einer Suspension von magnetischen Mikrobeads (Oxoid) bedeckt mit Hasenimmunglobulin, gerichtet gegen *H. pylori*, wird der vorbehandelten Fäkalsuspension zugegeben. Die Mischung wird für 1 Std. im Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Verwendung eines magnetischen Hilfsmittels werden die Mikropartikel mit 3 ml eines 20 mM Natriumphosphat Puffers pH 7,3, enthaltend 150 mM Natriumchlorid gewaschen.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben, um *H. pylori*-Antigene aus Bindungen mit endogenen Antikörpern abzuspalten, wobei besagte Vorbehandlung vor der Untersuchung auf *H. pylori*-Antigene im Stuhl mittels immunologischer Techniken durchgeführt wird.
2. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 1, wobei die Dissoziation der vorzugsweise endogenen Antigen-Antikörper-Bindungen erhältlich ist durch das in Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer chemischen Lösung.
3. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 2, wobei die chemischen Substanzen ausgewählt sind aus Säuren, Salzen, Basen, Detergenzien, organischen Lösungsmitteln oder Mehrfachalkoholen.
4. Verfahren zur Vorbehandlung einer Stuhlprobe gemäß Anspruch 1, wobei die Probe in einer Flüssigkeit suspendiert wird und wobei besagte Suspension auf eine Temperatur von über 40°C erhitzt wird.
5. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 4, wobei die Suspension der Stuhlprobe mittels Mikrowellen erhitzt wird.
6. Verfahren zur Vorbehandlung der Stuhlprobe gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, umfassend eine oder mehrere Methoden, die die erneute Bildung von Immunkomplexen zwischen *H. pylori*-Antigenen und endogenen Antikörpern verhindern.
7. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Komplexierung von *H. pylori*-Antigenen mit endogenen Antikörpern durch Hinzufügen von tierischem Immunglobulin, gerichtet gegen die Immunglobuline des Wirtes, von dem die Stuhlprobe kommt, inhibiert werden.
8. Verfahren zur Vorbehandlung der Stuhlprobe gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, das zusätzlich zu dem Prozess der Dissoziation einen Prozess der Abtrennung von *H. pylori*-Antigenen von endogenen Antikörpern umfasst.
9. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 8, wobei die Abtrennung von *H. pylori*-Antigenen von endogenen Antikörpern mittels Filtration erzielbar ist.
10. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Trennung von *H. pylori*-Antigenen von endogenen Antikörpern mittels Zentrifugation erzielbar ist.
11. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Vorbehandlung eine Untersuchung auf *H. pylori*-Antigene mit kompetitiven oder nichtkompetitiven immundiagnostischen Methoden vorangeht.
12. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Vorbehandlung eine Extraktion bakterieller DNA vorangeht.
13. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Behandlung die Isolierung von *H. pylori*-Kulturen aus dem Stuhl vorangeht.
14. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 11, wobei das gesuchte *H. pylori*-Antigen im Stuhl von Antikörpern erkannt wird, welche direkt gegen das *H. pylori*-Antigen mit der Größe von 16 + 2 kDa gerichtet sind, wobei die Größe in einer Acrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen bestimmt wurde.
15. Verfahren zur Vorbehandlung von Stuhlproben gemäß Anspruch 1 mit folgenden Schritten:
  - a) In Kontakt bringen der Stuhlprobe mit einer Flüssigkeit mit einem pH-Wert von weniger als 4;

# DE 102 19 741 A 1

b) Zentrifugieren der Suspension;

c) Abtrennen von Überstand und Niederschlag;

d) Wiederaufnahme des Niederschlags in einer Flüssigkeit mit einem pH-Wert von  $> 4$ .

16. Kit zur Vorbehandlung von Stuhlproben, gekennzeichnet durch wenigstens eines der Merkmale der Ansprüche 1 bis 15.

17. Kit für den immunologischen Nachweis von *H.pylori*-Antigenen in Stuhlproben, der einen Vorbehandlungsteil gemäß Anspruch 16 und einen Nachweisanteil aufweist, der vorzugsweise einen monoklonalen Antikörper verwendet.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65